Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Vorstand: Professor Dr. F. Haffner

Diazoreaktion des Thyroxins und ihre Hemmung durch Blutbestandteile.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhardt-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Dr. phil. Walter Komant
aus Hamburg

VERLAG VON F. C. W. VOGEL IN LEIPZIG

1930

Zum Druck genehmigt von der Medizinischen Fakultät
der Universität Tübingen

Dekan: Professor Dr. Haffner
Referent: Professor Dr. Kohlrausch

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dem Andenken meiner Mutter

in Dankbarkeit gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548026_0133

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE

UND

PHARMAKOLOGIE

REDIGIERT VON

Dr. L. KREHL
PROF. DER SPEZIELLEN PATHOLOGIE U. THERAPIE IN HEIDELBERG

UND

Dr. W. STRAUB
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE IN MÜNCHEN

Sonderabdruck aus 158. Band

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
(Vorstand: Professor Dr. F. Haffner)

WALTER KOMANT

Diazoreaktion des Thyroxins und ihre Hemmung durch Blutbestandteile

LEIPZIG
VERLAG VON F. C. W. VOGEL
1930

(Eingegangen am 8. X. 1930.)

Diazoreaktion des Thyroxins.

Die einzige, bisher bekannte Farbreaktion des Schilddrüsenhormons stammt von Kendall(1). Zu ihrer Ausführung löst man einige Milligramm Thyroxin in 5 ccm Alkohol mit 3—4 Tropfen starker Salzsäure und gibt 5—6 Tropfen einer 1%igen Natriumnitritlösung hinzu. Es entsteht eine gelbe Farbe, die sich beim Sieden vertieft. Die abgekühlte Lösung wird durch überschüssiges Ammoniak rosa gefärbt. Die Empfindlichkeit der Reaktion beträgt 1 : 40000. Sie wird nach Ingvaldsen und Cameron(2) mit gleicher Stärke von einer äquimolekularen Menge Dijodtyrosin gegeben und ist nach Haringtón für Orthodijodphenole charakteristisch. Sie hat Haringtón und Barger (4) bei der Synthese des Thyroxins wichtige Dienste geleistet, indem mit ihrer Hilfe die für die Stellung der Jodatome in Frage kommenden 26 Isomeren auf 7 vermindert werden konnten.

Wie ich nun vor einiger Zeit beobachtet habe, gibt Thyroxin in sodaalkalischer Lösung auch eine Diazoreaktion[1]). Man löst Thyroxin in kochender Sodalösung oder — leichter und zweckmäßiger — zuerst in Natronlauge, gibt Salzsäure dazu, bis die Substanz kolloidal ausfällt und löst sie dann spielend in der Kälte durch Sodazusatz. Im allgemeinen wurden folgende Mengenverhältnisse angewandt: 25 mg Thyroxin in 1 ccm 0,1 n NaOH gelöst, mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt; zu 1 ccm dieser »Thyroxinlösung 1 : 1000« kamen 0,3 ccm 0,1 n HCl, die entstandene Fällung löste sich bei Zusatz von 1 ccm Sodalösung (10 g wasserfreie Soda in

1) In einer Diskussion zu einem Vortrage des Herrn Prof. Haringtón in Tübingen am 19. III. 1930 im chemischen Kolloquium habe ich zum ersten Mal meinen ihm bis dahin noch unbekannten Befund der positiven Diazoreaktion des Thyroxins mitgeteilt.

100 ccm). Zu der so erhaltenen sodaalkalischen Lösung wird nun 1 ccm diazotierter Sulfanilsäure, die täglich frisch zu bereiten ist, zugegeben. Es tritt sofort Rotfärbung auf, in spätestens 5—10 Minuten ist die Lösung dunkelrot mit einem leichten Stich ins Violette: nach 5—10 Minuten beginnt eine geringe braune Verfärbung der Lösung merklich zu werden. Selbst nach mehrtägigem Stehen ist die dunkelrote Farbe noch zu erkennen. (Der Vergleich der Farben geschieht zweckmäßig gegen eine Mattglasscheibe als Hintergrund.) Zur Herstellung der Diazobenzolsulfosäurelösung werden 7 ccm einer salzsauren Lösung von Sulfanilsäure (hergestellt aus 0,9 g Sulfanilsäure, 9 ccm rauchender Salzsäure und 100 ccm Wasser), mit 30 ccm einer 5%igen Natriumnitritlösung versetzt, wobei man die beiden Lösungen vor dem Zusammengießen auf 0° abkühlt und das Reaktionsgefäß während der Diazotierung in Eis stellt. Die Diazobenzolsulfosäurelösung bewahrt man zweckmäßig in Eis auf.

Wie zu erwarten ist, reagiert Thyroxin auch mit anderen Diazoniumsalzen wie Diazobenzolarsinsäure (durch Diazotieren von Atoxyl gewonnen), diazotierter p-Amidobenzoesäure und Nitrosaminrot (durch Diazotieren von p-Nitroanilin hergestellt). Alle drei kuppeln in sodaalkalischer Lösung. Das Folgende bezieht sich ausschließlich auf die Reaktion mit dem Diazoniumsalz der Sulfanilsäure.

Bei dem oben angegebenen Verfahren wird das Diazoreagens im Überschuß zugefügt [seine Anwesenheit im Überschuß läßt sich durch Tüpfeln mit technischem H-Salz (1-Amino-8-naphtol-3, 6-disulfosaures Natrium) feststellen]. Fügt man statt der oben angegebenen 1-ccm-Diazolösung 3—4 ccm hinzu, so tritt nach 10 Minuten eine tiefviolette Farbe auf anstatt der oben beschriebenen dunkelroten, die ihrerseits auch nach tagelangem Stehen nie ausgesprochen violett wird. Die violette Färbung erweist sich merkwürdigerweise im Gegensatz zur roten beim Stehen an der Luft als äußerst unbeständig. An der Grenzfläche zwischen Farblösung und Luft beobachtet man zunächst braune und schließlich gelbe Färbung. Es handelt sich um einen Oxydationsprozeß, wie folgende Versuche zeigen. 1 ccm Thyroxinlösung 1:1000 wird mit 0,3 ccm n/10 HCl versetzt, das ausgefallene Thyroxin durch 1 ccm 10%iger Sodalösung wieder gelöst und 5 ccm Diazolösung hinzugefügt. Es genügt hier zum Ansäuern n/10 HCl wegen des großen Überschusses an saurer Diazolösung. Nach einigen Minuten ist das Reaktionsgemisch tiefviolett. Dann wird durch die eine Hälfte desselben in einem Reagenzglas 5 Minuten lang Sauerstoff hindurchgeleitet, wodurch sie braun und schließlich vollständig gelb wird. Die andere Hälfte, welche als Kontrolle im Reagenzglas an der Luft stehen bleibt, wird erst nach einigen Stunden gelb. Bei der kolorimetrischen Bestimmung von Thyroxin sind diese Dinge dementsprechend zu berücksichtigen.

Für die Kuppelung ist es wesentlich, daß sie in sodaalkalischer Lösung ausgeführt wird. Die Reaktion gelingt am besten bei einem

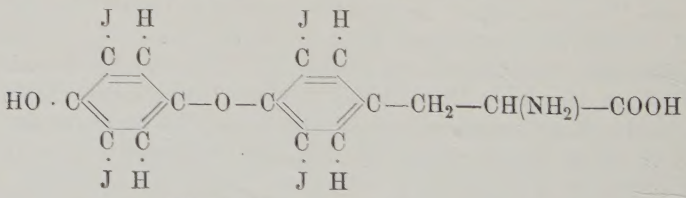
p_H zwischen 9—10. Wählt man statt Soda das entsprechende Volumen n/10 oder n/1 NaOH, so bleibt die Farbreaktion aus. Dass die Diazoniumsalze nur innerhalb eines ganz bestimmten p_H-Gebietes kuppeln, gilt ja allgemein. Anwesenheit von Ringer- und physiologischer Kochsalzlösung ändern den Farbton nicht.

Die Empfindlichkeit der Farbreaktion beträgt 1 : 100000. Bei dieser Verdünnung tritt nach 1—2 Minuten eine noch deutlich sichtbare Rosafärbung auf, die aber schon nach einigen Minuten verschwunden ist und einer gelben Farbe Platz macht.

Die Reaktion gelingt auch, wenn man das Thyroxin in 96%igem Alkohol und n/10 Alkali löst und weiterhin wie sonst verfährt. Beim Verdünnen mit Wasser ändert sich der dunkelrote Farbton des Thyroxins nicht. Beim Ansäuern mit Mineralsäuren oder Essigsäure schlägt er in Gelb, bzw. bei stärkerer Konzentration in Braun um. Durch erneutes Alkalisieren tritt wieder die ursprüngliche Färbung auf. Das Farbprodukt verhält sich also wie ein Indikator. Es erweist sich beim Kochen mit n/1 HCl und n/1 NaOH als beständig. Ebensowenig verändert Sieden nach reichlichem Zusatz von absolutem Alkohol den Farbton. Die Löslichkeit des Farbproduktes ist in Wasser auffallenderweise größer als die des schwer löslichen Thyroxins, was wohl auf die Sulfogruppe zurückzuführen ist; beim Ansäuern fällt es nicht aus.

Unter den Spaltprodukten des Eiweißmoleküls fand man bisher nur Histidin und Tyrosin befähigt, mit Diazobenzolsulfosäure echte Farbstoffe zu liefern. Es handelt sich bei dieser von Pauly (3) entdeckten Farbreaktion um Azofarbstoffbildung. Auch diese Verbindungen besitzen die verhältnismäßig leichte Löslichkeit in Wasser.

Die Reaktion des Thyroxins erscheint nun deshalb besonders interessant, weil nach der Formel von Harington und Barger, die man als durch die Synthese gesichert ansehen muß,



Thyroxin

die für die Kuppelung in Frage kommenden Ortho- und Parastellen besetzt sind, eine Diazoreaktion also gar nicht zu erwarten ist. Dies erklärt wohl auch, daß sie bisher nicht beobachtet worden war. Die Bildung einer Diazoaminoverbindung kommt nach dem geschilderten

Verhalten gegen kochende verdünnte Säure und Alkali wohl kaum in Betracht, denn die Unbeständigkeit der mit aliphatischen Resten verknüpften Diazoaminoverbindungen gegen verdünnte Mineralsäure in der Kälte ist bekannt. Schon lauwarmes Wasser bewirkt Zerfall derartiger Körper unter Entwicklung von gasförmigem Stickstoff. Vielmehr weist die Beständigkeit des Farbproduktes, der kräftige Farbton und die amphotere Natur desselben auf einen Eintritt des Diazorestes in einen der beiden Ringe hin. Hier bestehen nun mehrere Möglichkeiten. Entweder wandert ein Jodatom aus der Ortho- in die Metastellung oder es wird ganz herausgeworfen. In diesen beiden Fällen hätte man es mit einem Azofarbstoff zu tun. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß sich nach Dimroth, Leichtlin und Friedemann (5) ein Diazoäther bildet, d. h. die Vorstufe eines Oxyazofarbstoffes, dem es infolge der Besetzung der in Frage kommenden Stellungen nicht mehr möglich ist, sich weiter in den entsprechenden Azofarbstoff umzulagern. Doch spricht die Beständigkeit des Farbproduktes beim Kochen mit Alkohol sehr gegen diesen Verlauf. Obwohl alle diese Reaktionen höchstwahrscheinlich für einen Azofarbstoff sprechen, könnte der exakte Beweis nur durch das Verhalten des Farbstoffes gegen Reduktionsmittel erbracht werden. Wir sind zur Zeit noch mit der Aufklärung der Reaktion beschäftigt.

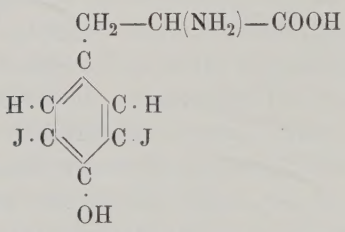
Für die Versuche benutzte ich in der Regel das synthetisch gewonnene Thyroxin »Schering«, das, wie auch verschiedene Derivate, von der Firma Schering-Kahlbaum, freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden war. Thyroxin »Roche«, Thyroxin »Henning« und das natürliche Thyroxin von Kendall (Thyroxin »Squibb«) zeigen genau dasselbe Verhalten.

Verhalten von Thyroxin- und Tyrosinderivaten.

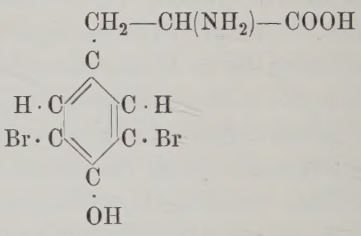
Ebenso glatt wie Thyroxin kuppelt sein Methyl- und Äthylester, deren Farbton von dem des Thyroxins kaum zu unterscheiden ist. Um eine Verseifung derselben möglichst auszuschließen, werden alle notwendigen Reagentien vorher bereits gemischt und zu dieser Lösung der Ester in fester Form hinzugefügt, woraufhin die Farbreaktion ebenso schnell wie beim unveresterten Thyroxin auftritt.

Abweichend vom Thyroxin verhält sich dagegen das Bromthyroxin, das auch biologisch nur minimale Hormonwirkung besitzt. (Die vier Jodatome des Thyroxins sind durch vier Bromatome ersetzt.) Eine 0,001 Mol-Lösung dieses Bromkörpers gibt eine schwache gelbe Farbe, während das entsprechende Volumen einer 0,001 Mol-Thyroxinlösung die übliche dunkelrote Farbe zeigt. Auch die Kendallsche Reaktion ist negativ. Beides macht eine Kuppelung wenig wahrscheinlich.

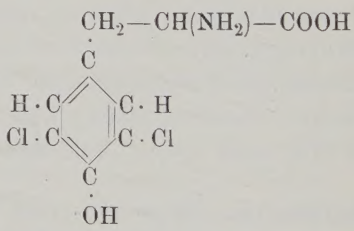
Es wurden auch noch einige andere dem Thyroxin ähnlich gebaute Stoffe untersucht, und zwar das 3,5-Dijodtyrosin, 3,5-Dibromtyrosin und 3,5-Dichlortyrosin. Sowohl das inaktive 3,5-Dijod- und 3,5-Dibromtyrosin kommen in der Natur vor und sind unter dem Namen Jodgorgo- und Bromgrogosäure bekannt. In dieser Reihe hat auch nur das Jodderivat eine sichere, wenn auch schwache Metamorphose beschleunigende Wirkung. (Da das im Handel in braunen Ampullen erhältliche, gelöste 3,5-Dijodtyrosin eine gelblichbraune Farbe zeigt, so benutzt man zweckmäßig die feste Verbindung, deren Reinheitsgrad leicht festzustellen ist.) In diesen drei Substanzen sind die für die Kuppelung in Frage kommenden Ortho- und Parastellen genau so wie im Thyroxin besetzt.



3,5-Dijodtyrosin



3,5-Dibromtyrosin



3,5-Dichlortyrosin

Vergleicht man 0,001 Mol-Lösungen dieser Derivate mit derselben Konzentration von Tyrosin, so findet man beim 3,5-Dichlortyrosin und 3,5-Dibromtyrosin nur eine schwache Gelbfärbung, während Tyrosin viel stärker (gelbbraun) gefärbt ist. Man kann wohl schließen, daß bei 3,5-Dichlor- und 3,5-Dibromtyrosin keine Azofarbstoffbildung eintritt, da infolge ihrer farbverstärkenden Substituenten eine mindest ebenso starke Färbung wie bei Tyrosin zu erwarten gewesen wäre, vorausgesetzt, daß die gleiche Anzahl von Diazoresten in den Benzolring eintritt. Im Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse von Hoppe-Seyler und Thierfelder (1924, S. 302) wird nur ganz kurz auf den negativen Ausfall der Paulyschen Diazoreaktion mit Dibromtyrosin

hingewiesen. Dijodtyrosin zeigt dagegen in verschiedenen Konzentrationen gleiche, stets aber etwas schwächere Farbe wie Tyrosin.

Ähnlich verhalten sich die Stoffe bei der Kendallschen Reaktion mit salpetriger Säure und Ammoniak. Nach Ingvaldsen und Cameron (2) gibt Dijodtyrosin die Kendallsche Reaktion in gleicher Stärke wie Thyroxin; mit Dibromtyrosin fällt sie nach diesen Autoren dagegen negativ aus, was ich bestätigen kann und auch für 3,5-Dichlortyrosin festgestellt habe. Haringtón (1) hält die Kendallsche Reaktion, wie erwähnt, als charakteristisch für Orthodijodphenole. Nach Wieland (6) reagieren so gut wie alle kuppelungsfähigen Stoffe auch mit salpetriger Säure. Diese Erfahrung scheint sich demnach auch hier zu bestätigen, trotz der Besetzung der Ortho- und Parastellen. Ob es sich bei der schwachen Färbung des 3,5-Dijodtyrosins mit Diazoreagens tatsächlich um eine Kuppelung handelt, bedarf allerdings noch weiterer Untersuchung. Diese Frage ist auch biologisch wichtig, weil interessanterweise gerade die beiden Jodderivate mit positiver Farbreaktion in ihrer Reihe durch positive Hormonwirkung ausgezeichnet sind.

Hemmung der Diazoreaktion durch Blutbestandteile und andere Substanzen.

Mit Hilfe der Diazoreaktion wurden nun auch Versuche über das Verhalten des Schilddrüsenhormons in Körperflüssigkeiten wie Blut und Harn angestellt. Die Kendallsche Reaktion eignet sich wegen ihren ungünstigeren Bedingungen und ihrer geringeren Empfindlichkeit dafür nicht. Es ist in den letzten Jahren von verschiedenen Seiten (7, 8) berichtet worden, daß sich das Hormon der Thyreoidea sowohl bei peroraler, subkutaner, intravenöser und intraperitonealer Zuführung schon einige Minuten nach der Applikation im Körper nicht mehr nachweisen lasse; Zawadowski und Perelmutter (9), ebenso Krayer (10) berichten allerdings von positiven Ergebnissen. Auch an Menschen mit den verschiedenartigsten Schilddrüsenerkrankungen war den meisten Forschern (7, 11, 12, 13, 14) kein Thyroxinnachweis im Körper gelungen. Auch beim Zusammenwirken von frisch entnommenem Rattenblut und Thyroxin im Reagenzglas hatte Romeis (15) die spezifische Wirkung auf die Metamorphose von Kaulquappen sehr stark abgeschwächt gefunden; schwächer fand er die Gegenwirkung einer entsprechenden Menge von Blutserum, während beinahe ebenso abschwächend wie das unverdünnte Blut das durch Zentrifugieren gewonnene Blutsediment wirkte.

Wir stellten zunächst Versuche mit Kaninchenserum an; Absorption des Hormons durch Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten kam

danach nicht in Frage. In allen Versuchen werden 25 mg Thyroxin in 1 ccm 0,1 n NaOH gelöst und mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt. $^1/_2$ ccm dieser Hormonlösung mischt man mit 1 ccm Kaninchenserum, fügt 0,3 ccm 0,1 n HCl hinzu, danach 1 ccm 10%iger Soda und schließlich 4 ccm Diazolösung. Diese große Menge Diazolösung ist notwendig, weil das Serum allein schon viel Diazoreagens verbraucht. In allen Fällen wurden durch Tüpfeln mit dem oben genannten Reagens auf überschüssige Diazolösung geprüft. Die Diazoreaktion wird durch das Serum fast vollständig unterdrückt. Zu demselben Ergebnis führte ein anderer Versuch mit so großem Überschuß an Diazoreagens, daß es noch 5 Minuten nach der Mischung durch Tüpfelprobe nachzuweisen war. Das Reaktionsgemisch bestand aus $^1/_2$ ccm Thyroxin, 1 ccm Serum, 1,5 ccm 10%iger Soda, 6 ccm Diazolösung. Auch hier zeigte sich gegenüber der Leerkontrolle kaum ein Unterschied. Werden diese beiden Versuche mit der gleichen Thyroxinmenge ohne Serum in wässeriger Lösung ausgeführt, so erhält man infolge des großen Überschusses von Diazoreagens bereits die oben erwähnte violette Färbung. Auch Harn stört die Farbreaktion. Bei Ausführung der Versuche mit Menschenharn, unter denselben Bedingungen wie bei den Serumversuchen, tritt die Hemmung der Diazoreaktion, allerdings in geringerem Maße, auf; der Kontrollversuch mit Thyroxin allein ist jedoch von dem Versuch mit Harnzusatz stets deutlich zu unterscheiden.

Besonders eklatant kommt die Störung der Farbreaktion durch Serum oder Harn zum Ausdruck bei Anwendung von starken Verdünnungen, weil dann die rote Eigenfärbung des Serums und des Harns (durch Reaktion mit dem Diazoreagenz) in Wegfall kommt. 1 ccm frisch entnommenes Kaninchenserum wird auf 250 ccm mit 0,9%iger Kochsalzlösung aufgefüllt; 1 ccm von dieser verdünnten Serumlösung (1 : 250) mit $^1/_2$ ccm Thyroxin, 1 ccm 10%iger Soda, 0,3 ccm norm. Salzsäure und zuletzt mit 1 ccm Diazolösung versetzt (Versuch A). Außerdem wurden wieder zwei Kontrollversuche angesetzt, der eine nur mit Serum ohne Thyroxin (Versuch B) und der andere mit physiologischer Kochsalzlösung und Thyroxin (Versuch C). Die fehlenden Volumina in diesen beiden letzten Versuchen wurden durch 0,9%ige Kochsalzlösung ergänzt. Schon nach 1 Minute war der Unterschied sehr deutlich:

Versuch A: Hellrosabraun.

Versuch B: Schwachgelblich.

Versuch C: Dunkelrot mit Stich ins Violette.

Selbst in einer Verdünnung des Serums von 1 : 500 macht sich der hemmende Einfluß desselben auf die Farbreaktion noch recht deutlich bemerkbar.

Menschenharn hemmt in denselben Verdünnungen ebenfalls, aber wieder weniger stark als Serum.

Es wurde auch die Reaktion mit Eiweißkörpern untersucht; eine Probe mit 1 ccm einer $^1/_{16}$%igen Gelatinelösung bei Konzentrationsverhältnissen der übrigen Reagentien wie oben ist gegenüber den beiden Kontrollversuchen (Gelatine ohne Thyroxin und Thyroxin allein) gut zu unterscheiden. Ebenso zeigt eine $^1/_{15}$%ige Lösung von Eierklar nach 5 Minuten langem Stehen gegenüber der Kontrollprobe eine geringere Färbung.

Da in allen Fällen Diazoniumsalz im Überschuß zugegeben wurde, so kommt die Hemmung wahrscheinlich dadurch zustande, daß die hemmenden Substanzen mit Thyroxin eine Bindung eingehen, welche die Reaktion mit dem Diazoniumsalz ausschließt. Zu erwähnen ist auch, daß zum Serum zugefügtes Thyroxin beim Ansäuern mit n HCl nicht mehr ausfällt, vielleicht nur eine Schutzwirkung der Kolloide, während sich unter gleichen Bedingungen aus dem Urin ein kolloidaler, flockiger Niederschlag abscheidet, der thyroxinhaltig ist.

Welches sind nun die Stoffe, welche für Störung der Reaktion durch Serum und Harn verantwortlich sind?

Es wurde zuerst Harnstoff geprüft, der ja im Serum den Hauptteil des Reststickstoffes ausmacht. Er stört nicht im geringsten, selbst wenn ein Vielfaches der im Blute vorkommenden Menge zugegen ist. Dagegen erweist sich die Harnsäure als stark hemmend. Bei dem Versuche mit Harnsäure wurde eine Konzentration derselben gewählt, wie man sie im Harn bei Gesunden findet. 33 mg Harnsäure werden unter Zusatz von 4 ccm 0,1 n NaOH in 50 ccm Wasser gelöst. 1 ccm dieser Lösung wird mit 1 ccm Thyroxin, 0,3 ccm n HCl und 1,5 ccm Diazolösung versetzt. Das Gemisch färbt sich etwas hellbräunlich, aber nicht dunkelrot. Harnsäure selbst gibt nur eine geringe gelbliche Färbung mit dem Diazoreagens. Nach Burian kuppelt sie nicht.

Aminosäuren stören ebenfalls in geringem Maße; es wurden Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure untersucht. Um eine weitgehende Hemmung zu erhalten, müssen die Versuche mit einer Menge von 5 mg Aminosäure in 1 ccm ausgeführt werden, also der sonst in 100 ccm Blut vorhandenen Menge.

Daß aber Harnsäure und ebenso Aminosäuren auch bei der im Serum vorhandenen geringen Konzentration (von jeder Komponente 4—5 mg% im Blut) die Reaktion bis zu einem gewissen Grade zu stören vermögen, geht aus folgenden Versuchen hervor:

a) 0,5 ccm Harnsäurelösung 1 : 1000 wurde mit 1 ccm frischem Kaninchenserum gemischt und mit 9 ccm Ringerlösung verdünnt. Zu jeder Probe wurden 1 ccm Thyroxin, 1,5 ccm 10%ige Sodalösung und 5 ccm der Diazolösung

hinzugefügt. Infolge des Zusatzes der Reagentien ist die Konzentration der gelösten Stoffe noch geringer als im Blute geworden.

b) Derselbe Versuch mit $^1/_2$ ccm Glykokollösung 1 : 1000.

c) ein weiterer Versuch mit $^1/_4$ ccm Glykokollösung und $^1/_4$ ccm Harnsäure.

d) Kontrollversuch, ohne Zusatz von Harnsäure bzw. Glykokoll.

a, b und c waren deutlich von dem dunkler gefärbten Kontrollversuch d zu unterscheiden.

Andere Körper, wie Traubenzucker (0,1%ig), Kreatin, Kreatinin, Lezithin und Cholesterin, zeigen bei den für sie im Blut in Frage kommenden Mengen nicht den geringsten Einfluß auf die Farbreaktion.

Außerdem war aber auch vom Eiweiß selbst Hemmungswirkung zu erwarten; nach Enteiweißung von Serum mittels Zinkhydroxyd zeigte in der Tat das mit Thyroxin versetzte Filtrat dieselbe starke Diazoreaktion wie reine Thyroxinlösung.

Die Hemmung durch Serum dürfte somit wesentlich durch das Serumeiweiß bedingt sein, weil dieses den anderen hemmenden Stoffen an Konzentration weit überlegen ist.

Über Hemmung der Diazoreaktion bei Histidin und Tyrosin durch Harnsäure, Aminosäuren u. a. hat Lautenschläger (16) berichtet. Eiweiß stört nach Lautenschläger in diesen beiden Fällen nicht.

Obwohl die Versuche nicht bei dem p_H des Blutes ausgeführt werden konnten (sondern bei p_H 9—10), weil die Thyroxinreaktion mit Diazobenzolsulfosäure an diesen p_H gebunden ist, sind sie vielleicht geeignet, neues Licht auf das Verhalten des Schilddrüsenhormons im Körper zu werfen. Wenn nämlich die erwähnten Stoffe auch unter den Verhältnissen im Organismus Thyroxin binden, so müßte z. B. bei Störung des hormonalen Gleichgewichtes die primäre Störung durchaus nicht immer in der Hormondrüse selbst liegen. Außerdem wäre es denkbar, daß solche Bindungen für das Nichtgelingen des Thyroxinnachweises innerhalb des Körpers, für den Schutz des Hormons gegen Unwirksamwerden im Magen-Darm, seine Resorption, für die bekannte Latenzzeit, und für die verschiedene Thyroxinresistenz (17) Bedeutung besitzen.

Weiter ist noch zu erwähnen, daß Menschenharn auch die durch Zusatz von Diazoniumsalz bereits rotgefärbte Thyroxinlösung wieder zu entfärben vermag. Auch der bekannte Azofarbstoff Naphtholorange, der aus Diazobenzolsulfosäure und β-Naphthol entsteht, wird durch Menschenharn entfärbt. Der hellgelbe Harn nimmt dabei eine hellbraune Farbe an. Die Versuche werden so ausgeführt, daß ein bestimmtes Volumen der gefärbten Tyroxinlösung in gleich großen und weiten Meßzylindern mit Urin bzw. anderen Flüssigkeiten verdünnt, durchgeschüttelt und mit den entsprechenden Kontrollversuchen verglichen wird.

Es ist darauf zu achten, daß die Farblösung kein überschüssiges Diazoreagens enthält, weil dieses mit Harn unter Rotfärbung reagiert. Um die überschüssige Diazolösung zu beseitigen, genügt meist Stehenlassen derselben über 5—10 Minuten. Die Farbänderung kommt nicht durch die Säurewirkung des schwach sauren Harns zustande, da die Reaktionsmischung alkalisch ist. Eine entsprechende Kontrollprobe ruft beim Verdünnen derselben Menge Farblösung mit Wasser keine Änderung der roten Farbe hervor. Ebensowenig kommen Harnsäure und Harnstoff als entfärbende Reagentien in Frage. Sie wurden in den im Urin vorkommenden Mengenverhältnissen untersucht. Diese nachträgliche Entfärbung ist für die Hemmung der Diazoreaktion nicht verantwortlich, da die Entfärbung erst bei einem großen Überschuß von Harn eintritt, während Hemmung schon durch viel kleinere Harnmengen erfolgt. Im Gegensatz zu Harn beeinflußt Kaninchenserum nur in ganz geringem Grade die schon entstandene Färbung, sie wird nur etwas bräunlicher.

Außerdem verdient hervorgehoben zu werden, daß bei allen angestellten Versuchen die Karboxylgruppe des Thyroxins keine wesentliche Rolle spielt, denn der Methylester und Äthylester verhalten sich genau so wie das unveresterte Hormon selbst. Einerseits deutet diese Beobachtung und andererseits die Hemmung der Diazoreaktion durch gewisse Blut- und Harnbestandteile darauf hin, daß sehr wahrscheinlich die Phenolgruppe für die Reaktionen des Thyroxins im Körper eine ausschlaggebende Rolle spielt.

Reaktion von Thyroxin mit Farbstoffen.

Endlich wurde noch beobachtet, daß auch Methylenblau, ebenso Methylviolett mit Thyroxin reagieren. Methylenblaulösung (1:50000) ändert bei Zugabe von Thyroxinlösung (1:1000) sofort ihre Farbe nach Grün hin. Es handelt sich dabei nicht um die Reduktion zur Leukobase, denn der Prozeß ist beim Stehen an der Luft oder beim Behandeln mit Oxydationsmitteln nicht reversibel. Methylviolettlösung wird durch Zusatz von Thyroxin blau. Jodlbauer (18) hat schon über ähnliche Beobachtungen von Reaktionen zwischen Alkaloiden und Farbstoffen berichtet, auch Bornsteins Ergebnisse gehören hierher (18).

Biologisches Verhalten »gebundenen« Thyroxins.

Es wurde dann weiter untersucht, wie sich das so an Serumkörper »gebundene« Thyroxin biologisch verhält. Hierzu wurden Mischungen von Thyroxin mit Serum bzw. Glykokoll hergestellt, in denen die Diazoreaktion aufgehoben war, und Kaninchen intravenös injiziert. Die Tiere wurden im Knippingschen Apparat gestoffwechselt und mit anderen

verglichen, die nur Serum oder Glykokoll erhalten hatten. In einer späteren Arbeit, in der über ausgedehnte Erfahrungen mit dem erwähnten Stoffwechselapparat berichtet werden soll, wird die Methodik im einzelnen beschrieben werden.

Kaninchen Nr. 89.

Datum 1929	Gewicht in g	O_2-Verbrauch in L. pro 1/2 Stunde (760 mm und 0° C)
	Normalversuche	
17. IX.	2270	0,56
18. IX.	2100	0,59
3 mg Thyroxin-Schering am 18. IX. (in n/10 NaOH gelöst, und zusammen mit 90 mg Glykokoll pro Kilogramm gleich nach dem Mischen intravenös injiziert)		
20. IX.	2070	0,68
21. IX.	1980	0,74
7. X.	1770	0,56

Der Sauerstoffverbrauch hat um 28% zugenommen.

Derselbe Versuch zeigte bei dem Kaninchen Nr. 111 folgende Ergebnisse:

Kaninchen Nr. 111.

Datum 1929	Gewicht in g	O_2-Verbrauch in L. pro 1/2 Stunde (760 mm und 0° C)
	Normalversuche	
19. IX.	2700	0,72
19. IX.	2700	0,68
	Injektion am 19. IX.	
20. IX.	2300	0,77
21. IX.	2470	0,80
24. IX.	2370	0,71

Die Steigerung des Sauerstoffverbrauches beträgt 14%.

Kaninchen Nr. 117.

Datum 1929	Gewicht in g	O_2-Verbrauch in L. pro 1/2 Stunde (760 mm und 0° C)
	Normalversuche	
23. IX.	1800	0,53
23. IX.	1800	0,54
90 mg Glykokoll pro Kilogramm am 23. IX. intravenös injiziert		
24. IX.	1670	0,59
25. IX.	1650	0,55

Die Steigerung des Sauerstoffverbrauches dieser Blindversuche (9%) liegt noch innerhalb der Fehlergrenzen der Methode. Auch die Gewichtsabnahme geht nicht über das Maß der Hungerwirkung hinaus.

Kaninchen Nr. 83.

Datum 1929	Gewicht in g	O_2-Verbrauch in L. pro 1/2 Stunde (760 mm und 0° C)
	Normalversuche	
19. IX.	2410	0,63
19. IX.	2410	0,66
3 mg Thyroxin am 19. IX. (in n/10 NaOH gelöst und mit 3 ccm Serum pro Kilogramm gleich nach dem Mischen intravenös injiziert. Das Serum hatte zur Entgiftung 22 Stunden im Eisschrank gestanden).		
20. IX.	2250	0,71
21. IX.	2120	0,77
24. IX.	1970	0,78
7. X.	2170	0,67

Der Sauerstoffverbrauch ist um 20% erhöht.

Kaninchen Nr. 99.

Datum 1929	Gewicht in g	O_2-Verbrauch in L. pro 1/2 Stunde (760 mm und 0° C)
	Normalversuche	
23. IX.	2670	0,71
23. IX.	2670	0,78
3 ccm Serum pro Kilogramm am 23. IX. intravenös injiziert.		
24. IX.	2600	0,71
25. IX.	2670	0,66

Der Sauerstoffverbrauch zeigt hier überhaupt keine Erhöhung; ebensowenig hat sich das Gewicht geändert, im Gegensatz zu den Thyroxinversuchen.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß der spezifische Einfluß des Thyroxins auf den Gasstoffwechsel durch die vorherige Mischung mit Serum oder Glykokoll nicht verändert worden ist. Leider war es mir bisher nicht möglich, das System auch an der Metamorphose von Kaulquappen nach Gudernatsch zu prüfen, wobei nach Romeis durch Blut Hemmung erfolgt.

Die Versuche werden fortgesetzt.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine neue Farbreaktion des Thyroxins beschrieben, die durch Einwirkung von Diazoniumsalzen eintritt und ihr Reaktionsmechanismus erörtert. Das biologisch fast unwirksame Bromthyroxin gibt die Reaktion nicht. Von den 3,5-Halogenderivaten des Tyrosins gibt ebenfalls nur das biologisch wirksame Dijodtyrosin positive Farbreaktion.

2. Gewisse Serum- und Harnbestandteile, wie Serumeiweiß, Harnsäure, Aminosäuren, stören die Farbreaktion des Thyroxins, was auf eine Bindung des Schilddrüsenhormons — in einer noch unbekannten Weise — an die genannten Substanzen zurückgeführt wird.

Harn ist außerdem imstande, auch den durch die Thyroxinreaktion bereits gebildeten Farbstoff zu entfärben.

3. Thyroxin zeigt auch mit Methylenblau oder Methylviolett ein Verhalten, das auf eine Bindung des Thyroxins an die Farbstoffe hinweist.

4. Was die biologische Bedeutung einer derartigen Bindung des Thyroxins an Eiweißkörper u. a. betrifft, so wurde bis jetzt nur untersucht, daß mit Serum oder Glykokoll ausreichend versetztes Thyroxin, an Kaninchen intravenös injiziert, keine Abnahme seiner gasstoffwechselsteigernden Wirkung erkennen läßt.

Literatur.

1. Kendall und Osterberg, Journ. of biol. chem. 1919, Bd. 40, S. 265. — 2. Ingvaldsen und Cameron, Chem. Zentralbl. 1927, Bd. II, Teil 2, S. 1854. — 3. Pauly, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 1904, Bd. 42, S. 508; 1915, Bd. 94, S. 284. — 4. Harington und Barger, Biochem. journ. 1926, Bd. 20, S. 300—313; 1927, Bd. 21, S. 169—181. — 5. Dimroth, Leichtlin und Friedemann, Ber. d. dtsch. chem. Ges. 1917, Bd. 50, S. 1534. — 6. Wieland, Die Praxis des organischen Chemikers 1927, S. 279. — 7. Abelin und Scheinfinkel, Ergebn. d. Physiol. 1925, Bd. 24, S. 690—700. — 8. Abderhalden und Wertheimer, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1929, Bd. 221, S. 82—92. — 9. Zawadowski und Perelmutter, Zeitschr. f. wiss. Biol. Abt. D; Wilh. Roux, Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen 1927, Bd. 109, S. 210—237. — 10. Krayer, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 1928, Bd. 128, S. 116. — 11. Wegelin und Abelin, Ebenda 1925, Bd. 105, S. 137. — 12. Rogoff, Journ. of pharmakol. a. exp. therapeut. 1918, Bd. 12. — 13. Kahn, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1922, S. 195. — 14. Sharpey-Shafer, Quart journ. of exp. physiol. 1923, Bd. 13, S. 131. — 15. Romeis, Biochem. Zeitschr. 1923, Bd. 141, S. 500—522. — 16. Lautenschläger, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 1918, Bd. 102, S. 226. — 17. Falta und Högler, Klin. Wochenschr. 1929, S. 1895. — 18. Verhandl. d. dtsch. pharmakol. Ges. 1924 (Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 1925, Bd. 105).

Printed in Germany.

Lebenslauf.

Am 16. 10. 1900 wurde ich, Walter Komant, in Hamburg geboren. Von 1912—1917 absolvierte ich die Realschule in Treuburg, um dann in Königsberg die Oberrealschule auf der Burg zu besuchen. Am 20. 6. 1918 wurde ich zum Heeresdienst eingezogen und erhielt die Versetzung nach Oberprima. Weihnachten 1918 wurde ich vom Militär entlassen und bestand nach einjährigem Besuch eines Kriegsteilnehmerkurses am 12. 9. 1919 die Reifeprüfung. Von 1920—1926 studierte ich in Königsberg Chemie und promovierte am 30. Januar 1926 zum Dr. phil.

Von 1926 bis heute studierte ich in Tübingen (vorher Königsberg) Medizin. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im November 1927 in Königsberg ab und gedenke im Frühjahr 1930 das Staatsexamen zu machen.